

## AMPLIFIKASI GEN COI DARI SAMPEL DARAH ULAR DENGAN MENGGUNAKAN BEBERAPA PASANGAN PRIMER UNIVERSAL

**Dylan R. Pahlevi\*, Edwin de Queljoe, Beivy J. Kolondam**

**Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sam Ratulangi, Manado 95115**

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi fragmen gen COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) dari darah ular. Empat sampel didapatkan dari empat individu ular berbeda yang berhasil ditangkap di Air Terjun Tapahan Telu, Desa Kali, Kabupaten Minahasa. DNA total dari sampel diisolasi dan kemudian Gen COI diamplifikasi melalui reaksi PCR (Polymerase Chain Reaction) menggunakan dua pasangan primer yaitu LCO1490-HCO2198 dan FF2d-FR1d. Keempat sampel ini berhasil diamplifikasi menggunakan primer yang berbeda, yaitu sampel DRP1 dan DRP3 oleh FF2d-FR1d dan sampel DRP2 dan DRP4 oleh primer LCO1490-HCO2198. Keberhasilan amplifikasi ditandai dengan adanya pita 710 bp (LCO1490-HCO2198) dan 707 bp (FF2d-FR1d), yang ditunjukkan dengan pita yang mendekati DNA ladder standar 750 bp.

**Kata kunci:** Ular, Amplifikasi, Gen COI, Primer, PCR

### ABSTRACT

**AMPLIFICATION OF COI GENE FROM SNAKE BLOOD SAMPLES USING TWO UNIVERSAL PRIMER PAIRS.** This study aims to amplify COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) gene fragments from snake blood. Four samples were obtained from four different snake individuals that were captured in Tapahan Telu Waterfall, Kali Village, Minahasa Regency. Total DNA from the sample was isolated and then the COI gene was amplified through the PCR (Polymerase Chain Reaction) reaction using two primer pairs, LCO1490-HCO2198 and FF2d-FR1d. These four samples were successfully amplified using different primers, i.e. DRP1 and DRP3 by FF2d-FR1d and DRP2 and DRP4 by LCO1490-HCO2198 primers. The success of amplification marked by the presence of 710 bp (LCO1490-HCO2198) and 707 bp (FF2d-FR1d) bands, which were indicated by those bands were located close to the standard 750 bp DNA ladder.

**Key words:** Snake, Amplification, COI gene, Primers, PCR

### PENDAHULUAN

Ular merupakan reptil karnivora tidak berkaki dengan tubuh memanjang dari Subordo Serpentes (Reeder *et al.*, 2015). Terdapat 217 spesies dari 3.508 spesies ular dari seluruh dunia yang tersebar dan dapat ditemukan di Indonesia terutama Sulawesi. (Inger and Voris, 2001). Sampai saat ini,

---

\*Korespondensi (*corresponding author*):  
Email: rezadylan@gmail.com

identifikasi ular di Sulawesi Utara masih dilakukan secara morfologis sedangkan untuk kajian genetika molekuler masih sangat terbatas.

Kajian berdasarkan morfologi saja tidak cukup untuk dijadikan acuan dalam identifikasi dan penentuan hubungan kekerabatan (Yuriadi *et al.*, 2014). Oleh karena itu, identifikasi secara molekuler diperlukan untuk kegiatan klasifikasi, serta mendapatkan data mengenai silsilah dan kekerabatan spesies (Puspita, 2016). Metode kajian molekuler yang dapat digunakan dalam identifikasi spesies ialah DNA barcoding (Madduppa, 2014). DNA Barcoding adalah sebuah metode identifikasi spesies secara cepat dengan menggunakan urutan pendek DNA sebagai alat pengidentifikasiannya (Hebert *et al.*, 2003).

Pengidentifikasi spesies menggunakan DNA Barcoding membutuhkan isolasi DNA genomik dan amplifikasi gen Cytochrome oxidase subunit I (COI) menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) sebagai tahap awalnya, kemudian dilanjutkan dengan sekuensing (Holmes *et al.*, 2008). Dalam tahap amplifikasi gen, terdapat

sebuah komponen penting yang menjadi penentu utama keberhasilan proses amplifikasi gen yaitu primer.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi fragmen COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) dari darah ular menggunakan dua pasang primer yaitu LCO1490-HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994; selanjutnya disebut sebagai Primer Folmer) dan FF2d-FR1d (Ivanova *et al.*, 2007; selanjutnya disebut sebagai Primer Ivanova) yang dianggap sebagai primer universal untuk DNA barcoding gen COI.

## **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

### **Tempat dan Waktu Penelitian**

Sampel ular diambil dari Air Terjun Tapahan Telu, Desa Kali, Kecamatan Pineleng, Kabupaten Minahasa. Ular yang diperoleh dimasukkan ke dalam kantong blacu dan dibawa untuk diambil jaringan darahnya. Ekstraksi DNA dan amplifikasi gen COI dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Universitas Sam Ratulangi. Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Maret – April 2019.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel ular.

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terbagi atas dua, yaitu peralatan di lapangan dan peralatan di laboratorium. Peralatan lapangan berupa *snake hook*, *snake pincher*, sarung tangan, kantung blancu dan gps. Peralatan di laboratorium meliputi tabung EDTA, jarum suntik 1cc, tabung Eppendorf, mikropipet, tips mikropipet, spin filter, *UV-Transilluminator*, dan alat elektroforesis. Bahan-bahan yang digunakan yaitu *Genomic DNA MiniKit* (Geneaid), MyTaq HS Red Mix (Bioline), ddH<sub>2</sub>O, dua set primer *forward* dan *reverse* gen COI, bubuk agarosa, buffer TBE (*Tris-Boric-EDTA*), DNA *Ladder*.

### Ekstraksi DNA

Jaringan yang digunakan yaitu darah ular. Ekstraksi DNA dari ular dilakukan menggunakan *Genomic DNA MiniKit*

(Geneaid) sesuai dengan instruksi manual. DNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi dengan metode PCR.

### Amplifikasi Gen COI dengan Metode PCR

Fragmen Gen COI target diperbanyak menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Gen COI dari darah ular diamplifikasi dengan pasangan primer LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') dan HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer *et al.*, 1994) dan pasangan primer FF2d (5'-TTC TCC ACC AAC CAC AAR GAY ATY GG-3') dan FR1d (5'-CAC CTC AGG GTG TCC GAA RAA YCA RAA-3') (Ivanova *et al.*, 2007). Tahap pertama ialah menyiapkan 40 µl reaktan PCR menggunakan MyTaq HS Red Mix (Bioline). Komponen dibuat dari campuran

20  $\mu\text{L}$  PCR Kit, 15  $\mu\text{L}$  dd  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,5  $\mu\text{L}$  primer *forward*, 1,5  $\mu\text{L}$  primer *reverse* dan 2  $\mu\text{L}$  sampel DNA yang dimasukkan ke dalam tabung PCR 0,2 mL (Kairupan *et al.*, 2015). Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam *thermal cycler*. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus berdasarkan Kolondam (2015) dengan modifikasi, yaitu diawali dengan 95°C selama 3 menit dan dilanjutkan dengan suhu 95°C selama 30 detik (denaturasi awal), 50°C selama 30 detik (penempelan primer), dan 72°C selama 30 detik (pemanjangan DNA). Hasil PCR kemudian divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa.

### **Elektroforesis**

Elektroforesis DNA yang sudah teramplifikasi dilakukan dengan membuat agarose 1% terlebih dahulu. Bubuk agarose sebanyak 1 g dicampur dalam 100 mL Buffer TBE lalu dipanaskan hingga mendidih. Gel agarose dicetak bersama sisirnya untuk membuat sumur-sumur.

Setelah mengeras, gel dipindahkan ke dalam alat elektroforesis yang sudah digenangi dengan Buffer TBE 1x. DNA *Ladder* sebanyak 10  $\mu\text{L}$  digunakan untuk menghasilkan ukuran pita DNA dalam gel

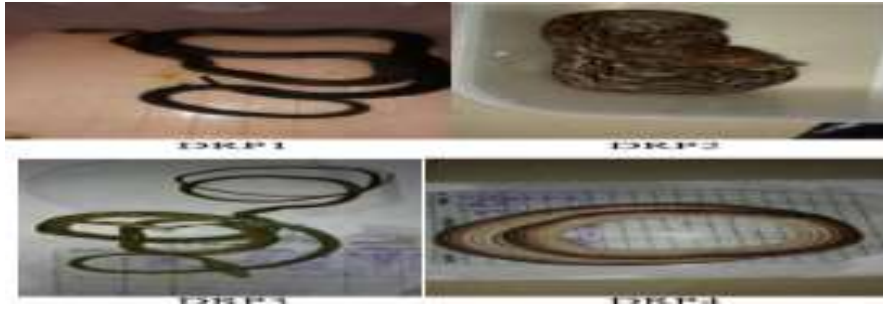
agarosa dengan memipet langsung produk PCR ke dalam sumur-sumur gel. Gel kemudian diberi tegangan listrik sebesar 100 Volt selama 30 menit melalui alat elektroforesis dan hasilnya divisualisasikan dengan *UV-Transilluminator*.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Koleksi dan Penanganan Sampel**

Terdapat empat individu ular yang berhasil diperoleh dari Air Terjun Tapahan Telu Desa Kali. Keempat individu tersebut diduga dari spesies yang berbeda dan masing-masing diberi label DRP1, DRP2, DRP3, dan DRP4. Morfologi ke empat specimen ular ini dapat dilihat pada Gambar 2.

Sampel darah diambil dari pembuluh *vertebral* di area *caudal* menggunakan jarum suntik 1 cc pada sampel DRP1, DRP2, dan DRP4 yang kemudian akan digunakan untuk ekstraksi DNA. Karena sudah ditemukan dalam keadaan mati, sampel jaringan yang digunakan untuk ekstraksi DNA dari DRP3 yaitu sampel jaringan otot dorsal.



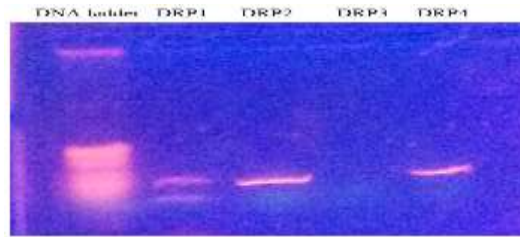
Gambar 2. Empat spesimen ular yang ditemukan di Air Terjun Tapahan Telu Desa Kali.

### Amplifikasi Gen COI dan Elektroforesis Gel

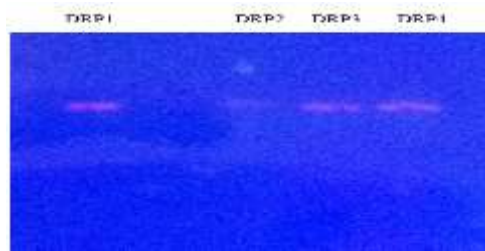
Visualisasi elektroforesis produk PCR hasil amplifikasi gen COI dari sampel DNA keempat ekor ular menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) dengan menggunakan gel agarose ditampilkan pada Gambar 3. Hasil analisis elektroforesis gel menunjukkan bahwa pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 berhasil mengamplifikasi gen COI dari sampel ular DRP2 dan DRP4 ditandai dengan adanya tampilan pita DNA tunggal pada jalur lintasan gel untuk sumur nomor DRP2 dan DRP4 (Gambar 3). Hasil pada Gambar 3 juga menunjukkan bahwa sampel DRP1 dan DRP3 memiliki hasil negatif amplifikasi Gen COI menggunakan pasangan primer Folmer. Hal ini ditandai dari adanya pita DNA ganda pada sumur DRP1, sedangkan pada DRP3 tidak terdapat pita DNA. Adanya pita ganda pada DRP1 dapat disebabkan oleh primer yang

kurang spesifik. Kurang spesifiknya penempelan primer akan menyebabkan pengamplifikan daerah yang bukan menjadi target (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Pada DRP3 sendiri, tidak adanya pita dapat disebabkan karena ketidakcocokan primer dengan dengan urutan nukleotida target (Newton and Graham, 1994). Hasil negatif pada kedua sampel ini juga dapat dipengaruhi oleh faktor suhu saat *annealing*. Jika suhu terlalu tinggi akan menyebabkan gagalnya penempelan primer, sebaliknya jika suhu terlalu rendah primer akan menempel pada sisi lain genom sehingga menurunkan spesifisitas primer (Rybicky, 1996).

Produk PCR keempat sampel kemudian diujicoba untuk diamplifikasi menggunakan pasangan primer FF2d (5'-TTC TCC ACC AAC CAC AAR GAY ATY GG-3') dan FR1d (5'-CAC CTC AGG GTG TCC GAARAA YCARAA-3') (Ivanova *et al.*, 2007) yang hasilnya ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 3. Visualisasi produk PCR hasil amplifikasi gen COI keempat sampel menggunakan pasangan primer Folmer.

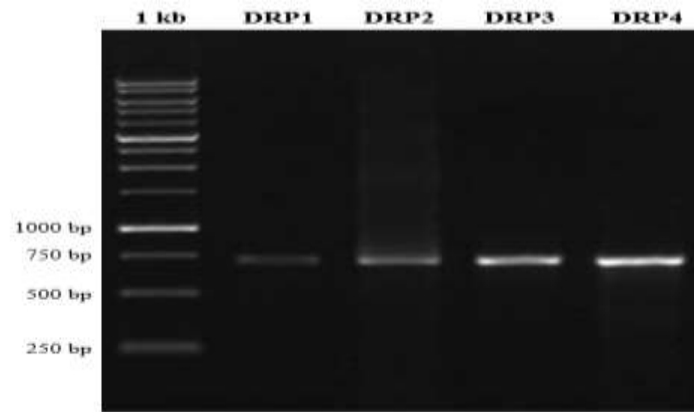


Gambar 4. Visualisasi produk PCR hasil amplifikasi gen COI keempat sampel menggunakan pasangan primer Ivanov.

Gambar 4 menunjukkan bahwa pasangan primer Ivanova berhasil mengamplifikasi gen COI dari produk PCR keempat sampel yang ditandai oleh adanya tampilan pita DNA pada jalur lintasan gel masing-masing sampel. Walaupun amplifikasi berhasil, pita DNA pada DRP1 dan DRP2 terlihat samar-samar. Handoyo dan Rudiretna (2000) menyatakan bahwa pita DNA yang samar kemungkinan diakibatkan oleh rendahnya konsentrasi DNA hasil ekstraksi. Keberhasilan pasangan primer Ivanova dalam mengamplifikasi gen COI sampel DRP1 dan DRP3 menunjukkan bahwa pasangan primer ini lebih cocok dengan urutan nukleotida kedua sampel daripada pasangan primer Folmer.

Produk PCR keempat sampel kemudian diamplifikasi kembali menggunakan pasangan primer berbeda yang berhasil mengamplifikasi masing-masing sampel pada uji sebelumnya. DRP1 dan DRP3 menggunakan pasangan primer Ivanova sedangkan DRP2 dan DRP4 menggunakan pasangan primer Folmer. Hasil visualisasi elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 5.

Hasil visualisasi elektroforesis menunjukkan DRP1 dan DRP2 memiliki pita DNA yang samar dan kemungkinan diakibatkan oleh rendahnya konsentrasi DNA hasil ekstraksi. Hasil ini juga menunjukkan bahwa DRP1 dan DRP3 dapat diamplifikasi oleh pasangan primer FF2d dan FR1dsaja sedangkan DRP2 dan DRP4 dapat diamplifikasi oleh pasangan



Gambar 5. Visualisasi elektroforesis hasil amplifikasi gen COI keempat sampel menggunakan pasangan primer yang berbeda.

primer FF2d dan FR1d (Ivanova *et al.*, 2007) dan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Hal ini menunjukkan bahwa amplifikasi gen COI ular membutuhkan pasangan primer spesifik yang sesuai dengan urutan nukleotida DNA target dari sampel. Berdasar ukuran DNA *ladder* dengan panjang 1kb sebagai pembanding terlihat bahwa ukuran masing-masing sampel DNA mendekati DNA ladder 750 bp. Berdasarkan Folmer *et al.* (1994), target amplifikasi hasil PCR memiliki panjang 710 bp. Ivanova *et al.* (2007) juga mengamplifikasi DNA gen COI dengan panjang 707 bp.

### KESIMPULAN.

Gen COI sampel darah ular DRP1 dan DRP3 berhasil diamplifikasi menggunakan pasangan primer FF2d-FR1d, sedangkan sampel DRP2 dan DRP4

dapat diamplifikasi menggunakan semua pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini, yang ditandai dengan munculnya pita pada posisi mendekati 750bp.

### DAFTAR PUSTAKA

- Folmer, O., M. Black, W. Hoew, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA Primers for amplification of mitochondrial cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 3(5): 294-299.
- Handoyo, D. and A. Rudiretna. 2000. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas* 9(1): 17-29
- Hebert, P.D., A. Cywinska, S.L. Ball. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences* 270 (151): 313-321.

- Holmes, B.H., D. Steinke, R.D. Ward. 2008. Identification of shark and rays fins using DNA Barcoding. *Fisheries Research* 95(2): 280- 288.
- Inger, R.F. and H.K. Voris. 2001. The biogeographical relations of the frogs and snakes of Sundaland. *Journal of Biogeography* 28(7): 863-891.
- Ivanova, N.V., T.S. Zemlak, R.H. Hanner, P.D. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7(4): 544-548.
- Kolondam, B. J. 2015. Applying matK gene for identification of liliopsida plant species from North Sulawesi Through bold systems. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 6(2): 242-245.
- Madduppa, H. 2014. *Bioekologi dan Biosistematika Ikan Terumbu*. IPB Press, Bogor.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. *PCR*. Bios Scientific Publisher, London.
- Puspita, I. 2016. *Identifikasi Molekuler Kuskus (Phalangeridae) Asal Maluku Berdasarkan Sekuen Gen Penyandi NADH Dehydrogenase Subunit 2* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta.
- Reeder, T.W., T.M. Townsend, D.G. Mulchany, B.P. Noonan, P.L. Wood Jr, J.W. Sites Jr, and J.J. Wiens. 2015. Integrated analyses resolve conflicts over squamate reptile phylogeny and reveal unexpected placements for fossil taxa. *PLOS one*. 10(3): e0118199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118199> [30 September 2018].
- Rybicky, E. P. 1996. *PCR Primer Design and Reaction Optimisation. Molecular Biology Techniques Manual*. Dept. of Microbiology. Cape Town University.
- Yuriadi, Y., R. Widayanti, T. Artama. 2014. Analisis Genetika Molekuler Kuda Sumba Berdasarkan Urutan D-loop Mitokondria. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8(1): 23-26.